

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500442

研究課題名(和文)APP細胞内ドメインによって誘導される神経細胞選択的細胞死の解析

研究課題名(英文)Analysis of the neurotoxicity which is induced by the intracellular domain of APP

研究代表者

中山 耕造 (NAKAYAMA, Kohzo)

信州大学・医学部・講師

研究者番号：70192680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、培養細胞を用いてAPPの細胞内ドメイン(AICD)が核へ移行し、多くの遺伝子の発現を変化させ、神経細胞死を引き起こす事を示している。本研究では、AICD結合転写因子を同定し、遺伝子発現を変化させる原因である事を示した。また、AICDの核移行を調節しているAICD脱リン酸化酵素を部分的に精製した。今後、それをマスマスペクトルによって同定する予定である。さらにAICDを脳選択的に発現するトランスジェニックマウスの作製を試みたが、AICDの神経毒性のため胎生致死となった。今後、毒性を回避するためにBrainbowを用いて、半数以下の脳神経細胞でAICDを発現するマウスを作製する予定である。

研究成果の概要(英文)：It has shown that the intracellular domain of APP (AICD) is released from the cell membrane into the cytoplasm by gamma-secretase and translocates to the nucleus. We have also shown that AICD markedly altered gene expression in the nucleus, and induced neuron specific apoptosis.

In this study, we identified a large number of transcription factors which bound to AICD. These results suggest the reason why AICD can control expressions of many genes. From the point of view of apoptosis, E2F1 will be focused. In addition, we partially purified the AICD-phosphatase which may control translocation of AICD to the nucleus. We will identify this enzyme by a mass spectrum. Furthermore, we tried to make the transgenic mice which specifically express AICD in brain. Unfortunately, these mice were embryonic lethal that may be caused by strong neurotoxicity of AICD. To evade embryonic lethal, we will try to make mice, which express AICD only in less than half of brain neurons using Brainbow strategy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

 キーワード：アルツハイマー病 ーセクレターゼ APP 細胞内ドメイン 認知症 神経変性疾患 シグナル伝達  
アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

Amyloid Precursor Protein (APP)は、アルツハイマー病(AD)との関連は明確になっているが、その生理的な機能の解析は十分とは言えない。従って、APPの生理的機能を解析することは基礎研究として重要なだけでなく、より深くADを理解するためにも、さらには新規作用機序を持つ治療薬の開発等の応用にとっても極めて重要であると思われる。

我々は、NotchやDeltaの解析から、-セクレターゼの本来の生理機能はある種の1型膜蛋白質のシグナル伝達の調整にあり、それがAmyloid Precursor Protein (APP)のシグナル伝達を通してアルツハイマー病(AD)の発症に関係しているのではないかと推測している。

### 2. 研究の目的

実際我々は、培養細胞を用いて、APPの細胞内ドメイン(AICD)が遺伝子の発現を大きく変化させ、神経細胞選択的に細胞死を引き起こす事を明らかにしている。本研究の目的は、このAICDに誘導される細胞死のメカニズムを分子生物学的・生化学的に明らかにする事にある。具体的には、以下の3点を目標に研究した。

(1) NotchやDeltaの解析結果から類推すると、AICDが特定の転写因子と結合し、特定の遺伝子の発現を調節することによってアポトーシスを引き起こしている可能性が考えられる。この点を明らかにする第一歩として、AICDに結合する転写因子を同定し、遺伝子発現に対する影響を調べる。

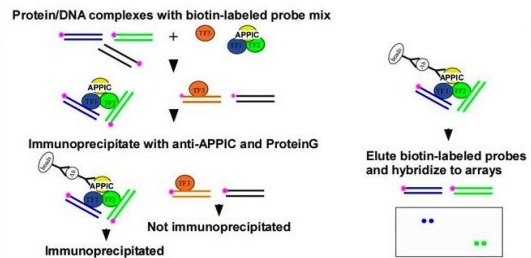
(2) -セクレターゼによって細胞膜から切り出されたAICDは、核に移行して遺伝子発現を変化させ、神経細胞死を誘導していると考えられるが、このAICDの核移行にAICD自体のリン酸化-脱リン酸化が関係している可能性が考えられ、関係する酵素、特に脱リン酸化酵素の同定を目指す。

(3) さらにAICDを脳選択的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、このAICDに誘導される細胞死が部分的にでもADの発症を反映していないか調べる事を目的にする。

### 3. 研究の方法

(1) 特定の蛋白質に結合する転写因子を同定するために、我々が開発した新しい方法(Nucleic Acids Research, 2007)を用いた。図のように、アダルトもしくは胎児の脳細胞から核蛋白質を抽出し、既知の154種類の転写因子のDNA結合配列を合成して加え、AICDに対する抗体を用いて免疫沈降する。転

写因子にはそれに相対する結合配列の合成DNAが結合しており、もし転写因子がAICDに結合すれば、AICD/転写因子/合成DNAの三者の複合体が免疫沈降されるはずである。この沈降した複合体からDNAを回収し、同じセットの合成DNAをプロットしたアレイとハイブリダイズさせ、AICDと共沈降した転写因子に結合しているDNA配列を明らかにする。この結果、すなわちどの転写因子に対する結合配列が共沈降したかにより、AICDに結合する転写因子を推定した。



(2) AICDの脱リン酸化酵素の精製は、定法に従っておこなった。具体的には、マウスの脳のライセートを作製し、これを定法に従いイオン交換及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーをおこない部分的に精製した。各分画の脱リン酸化活性の定量は、大腸菌で産生したリコンビナントAICDを32Pでラベルしたものを基質とし、遊離した32Pを測定することによりおこなった。

(3) 前述したように培養細胞の実験から、AICDは神経毒性が強いことが予想される。実際に通常のトランスジェニックマウス(Tg)を作製すれば胎生期に致死となり、AICDを発現するマウスは生まれて来ない。このAICDの強い毒性を回避するために、厳密に発現をコントロールする必要があり、今回はリークの少ないTet-Offの系を用いた。従って、我々の作成したTgでは、Doxの存在下ではAICDは発現しないが、Doxを除くことによりAICDの発現を誘導することができると考えた。

### 4. 研究成果

(1) AICDに結合する、転写因子の同定。

図1に示すように、アダルトの脳を用いた場合、多くのシグナルが検出された。これらのシグナルは、胎児の脳を用いた場合にはみられない。また、同様の方法を用いて、Deltaの細胞内ドメイン結合転写因子を検出したところSmadのみが極めて選択的に検出されており(Nucleic Acids Research, 2007)、これらのシグナルは非特異的なものではなく特異的だと考えられた。

前述したように、我々は培養細胞を用いて、AICDが多くの遺伝子の発現を変化させる事を示している。このようにAICDが多くの転写因子に結合できる事が、多くの遺伝子の発現を変化させる原因である可能性が考えら

れた。

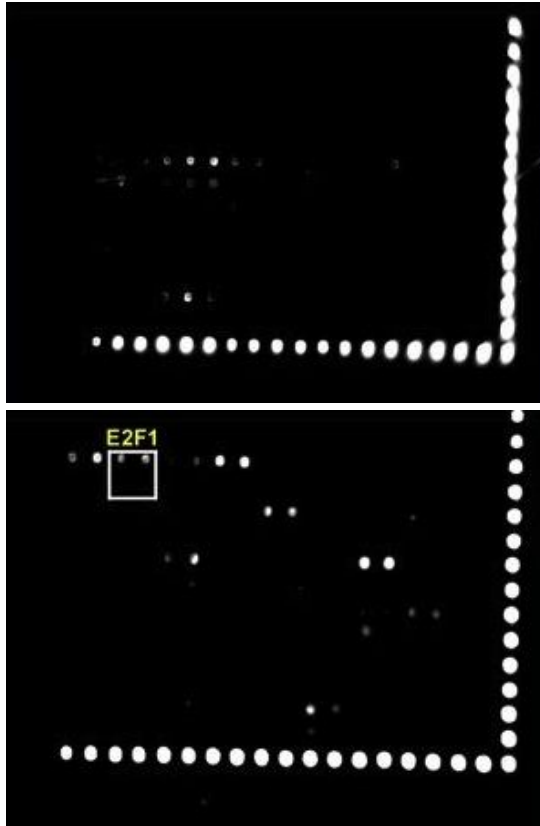


図1. 胎児(図上)とアダルト(図下)の脳に存在する、AICD結合転写因子のスクリーニング。

現在アポトーシスの観点から、E2F1の解析を進めている。

### (2) AICD脱リン酸化酵素の精製

AICD脱リン酸化酵素は、セリン/スレオニンホスファターゼであり、細胞質に存在する可溶性蛋白質である可能性が高い。そこで脳をホモジェネートし、遠心してライセートを得て、DEAE sepharose カラムに添加した。カラムからの溶出は、NaClの濃度勾配によっておこなった。各フラクションの一部は脱リン酸化反応液(20mM Tris pH7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM EGTA, 0.03%Brij)に対して透析し、前述の方法で脱リン酸化酵素活性を測定した。

図2. DEAEカラム分画によるAICD脱リン酸化活性

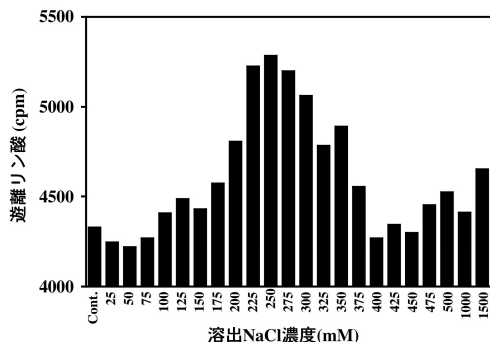


図2は、各フラクションの脱リン酸化酵素活性をグラフにした物である。225-300mMの

NaClで溶出したフラクション、それに350mM及び500mMのフラクションに酵素活性のピークが検出された。同様の実験を繰り返したところ、225-300mMのNaClで溶出したフラクションは常に脱リン酸化酵素活性を持つが、350mM及び500mMのフラクションに関しては再現性が乏しい事が判明し、現在は225-300mMのNaClで溶出したフラクションを中心に解析を進めている。

225-300mMのNaClで溶出したフラクションの脱リン酸化酵素反応を測定する時に、反応液にカルモジュリンとカルシウムを加えると、活性が約1.5倍に上昇した。この事から、この酵素がカルシニューリンである可能性が考えられた。この点を明らかにするために、抗カルシニューリン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なったところ、225-300mMのフラクションではカルシニューリンは検出できなかった。この結果は、AICD脱リン酸化酵素はカルシニューリンではない事を示しているが、それではなぜカルモジュリンとカルシウムが存在すると活性があがるのかと言う事に関しては、今のところ原因は分からない。

前述のように、DEAEクロマトグラフィーで、225-300mMのNaClで溶出したフラクションは、安定して高いAICD脱リン酸化酵素活性を示すので、これらのフラクションを更に精製する事にした。DEAEカラムから225mMのNaClで溶出したフラクションをさらにHydroxyapatiteカラムに吸着させ、リン酸濃度を上げる事により蛋白質を溶出した。得られた各フラクションの一部は脱リン酸化反応液(20mM Tris pH7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM EGTA)に対して透析し、前述の方法で脱リン酸化酵素活性を測定した。

図3. DEAE NaCl 225mM分画のハイドロキシアパタイトカラム分画によるAICD脱リン酸化活性

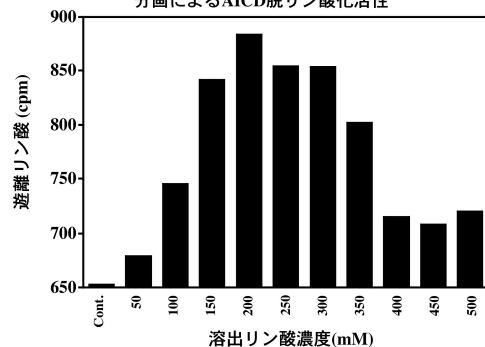


図3に示すように明確な活性のピークは見られず、150mMから300mMのリン酸で溶出したフラクションが幅広く高い脱リン酸化酵素活性を示した。うまく分画できていない可能性も考えられたので、各フラクション10µlをSDS電気泳動して、銀染色をおこなった。その結果、各フラクションでバンドのパターンが明らかに異なり、分画自体はうまくいっている事が明らかになった。しかしながら、AICD脱リン酸化酵素活性と相関するバ

ンドは検出できず、さらなる精製が必要である事がわかった。次のステップとして、ゲル濾過による分画を早急に行なう予定である。

精製後電気泳動をおこない、AICD 脱リン酸化酵素活性と相関するバンドが検出できた場合、バンドから蛋白質を抽出してマススペクトルにより蛋白質を同定する予定である。

(3) トランスジェニックマウス(Tg)の作製

新潟大学脳研究所の協力を得て、tTA 依存プロモーターの下流に AICD を連結したベクターをマウスの受精卵に注入して、100匹のマウスを誕生させた。さらに、信州大学においてこれらのマウスの尾から DNA を抽出し、サザンブロッティングをおこなったところ、27匹が Tg (AICD-Tg) であることが判明した。

Jackson 研究所から、CamKII 遺伝子のプロモーターの下流に tTA 遺伝子を繋いで作製した Tg (CamKII-tTA-Tg) を入手した。このマウスは CamKII 遺伝子のプロモーターを持つために、生後1週目以降の脳でのみ tTA を発現している。

新潟大学脳研究所において、これらの27種類の AICD-Tg と CamKII-tTA-Tg を交配しダブル Tg を作製した。生後4週、8週、16週、32週というように各時期に飲み水から Dox を除き AICD を誘導したが、残念ながらウエスタンブロッティングによる蛋白質レベルでの発現を認められる系統は得る事ができなかった。

前述したように AICD は極めて神経毒性が強く、現在のところ我々も含めて、世界中で蛋白質レベルでの発現が認められる Tg は得られていない。本研究では、より厳密に発現をコントロールできる Tet-Off の系を用いたが、わずかにリークする AICD の神経毒性によって胎生致死になった可能性が高い。この強力な神経毒性を回避するために、今後 Brainbow ベクターを用いて、半数以下の脳神経細胞にのみ AICD を発現する Tg を作製する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

(1) Nagase H. and Nakayama K., -Secretase-regulated signaling typified by Notch signaling in the immune system. **Current Stem Cell Research and Therapy** (査読有), **8**, 392-407, 2013. DOI:10.2174/1574888 X113 089990054.

(2) Nakayama K., Nagase H., Koh C.S. and Ohkawara T., -Secretase-regulated signaling: Notch, APP, and Alzheimer's disease. **Current Psychopharmacology** (査読有), **1**, 155-166, 2012. DOI:10.2174/22115560112010 20155.

(3) Nakayama K., Nagase H., Koh C.S. and Ohkawara T.,  $\gamma$ -Secretase-regulated mechanisms similar to Notch signaling may play a role in signaling events, including APP signaling, which leads to Alzheimer's disease. **Cell Mol. Neurobiol.** (査読有), **31**, 887-900, 2011. DOI :10.1007/s10571-011-9688-z.

(4) Ohkawara T., Nagase H., Koh C.S. and Nakayama K., Amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis. **Gene** (査読有), **457**, 1-9, 2011. DOI:10.1016/j.gene.2010.11.014.

(5) Nagase H., Koh C.S., and Nakayama K.,  $\gamma$ -Secretase-regulated Signaling Pathways, such as Notch Signaling, Mediate the Differentiation of Hematopoietic Stem Cells, Development of the Immune System, and Peripheral Immune Responses. **Current Stem Cell Research and Therapy** (査読有), **6**, 131-141, 2011 DOI:10.2174/1574888117 9549 5459.

[図書](計 3件)

(1) Nakayama K., Nagase H., Koh C.S. and Ohkawara T., -Secretase-regulated signaling and Alzheimer's Disease. **Understanding Alzheimer's Disease**, ed. by I. Zerr, Intech Publishers, Inc., Croatia, **Chapter 4**, 61-88, 2013

(2) Nakayama K., Nagase H., Koh C.S. and Ohkawara T., Amyloid precursor protein: its signaling aspect and Alzheimer's disease. **Amyloids: Composition, Functions and Pathology**, ed. by I.P.Halcheck and N.R. Vernon, Nova Science Publishers, Inc., NY, **Chapter 2**, 33-59, 2012.

(3) Nakayama K., Nagase H., Koh C.S. and Ohkawara T.,  $\gamma$ -Secretase-regulated signaling mechanisms: Notch and amyloid precursor protein. **Neural Stem Cells**, ed. by T. Sun, Intech Publishers, Inc., Croatia, **Chapter 8**, 161-188, 2012.

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 耕造 (NAKAYAMA Kohzo)  
信州大学・医学部・講師  
研究者番号：70192680

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：